

The Differences of Antibacterial Effect between Calcium Hydroxide and Propolis Extract against Fusobacterium nucleatum

(Perbedaan Daya Antibakteri Kalsium Hidroksida dan Ekstrak Propolis terhadap Fusobacterium nucleatum)

Meilita Wulandari¹, Ira Widjiastuti², M.Roelianto²

¹Mahasiswa Strata-1 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

²Staff Pengajar Departemen Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

ABSTRACT

Background. One of gram negative bacteria that cause caries is *Fusobacterium nucleatum*, one of them is at plaque the teeth and caries profunda. Caries on the teeth can be handled with the application of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ or calcium hydroxide. But since the high pH level can lead to chronic inflammatory and damage the soft tissue, so it needs an alternative material that can eliminate side effects. An alternative material used is propolis extract containing flavonoid compound, tannin and other synergistic compound as an antibacterial. **Purpose.** To tell the differences of power antibacterial effects between an calcium hydroxide propolis extract against *Fusobacterium nucleatum*. **Method.** This research used a sample of the *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 grown in Brain Heart Infusion Broth (BHIB). The antibacterial material applied against the bacterium *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 was MIC 1.5% of propolis extract and MIC 13% of suspense $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pro analysis with the methods spriding on media Mueller Hinton Agar (MHA). Incubation at a temperature of 37°C for 2 x 24 hours in anaerobic jar, finally colony counting *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 grows on MHA by manual observed by 3 people observer expressed by Colony Forming Unit (CFU). **Conclusion.** It can be concluded from the result of this research that no difference of antibacterial effects between 1,5% extract propolis and 13% calcium hydroxides against *fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 is shown.

Key words: Calcium hydroxide, Propolis extract, *Fusobacterium nucleatum*.

Correspondence: Meilita Wulandari, Faculty of Dentistry, Airlangga University. Jln. Mayjend. Prof. Dr. Moestopo, No. 47 Surabaya 60132. Indonesia. Email : meilitawulandari@gmail.com

PENDAHULUAN

Fusobacterium nucleatum adalah bakteri gram negatif anaerob obligat yang ditemukan sebesar 5,74% dan merupakan salah satu bakteri penyebab karies, ditemukan pada plak gigi, saluran akar dan infeksi periodontal.¹ *Fusobacterium nucleatum* diduga sebagai salah satu bakteri penyebab timbulnya reaksi hipersensitivitas gigi, hal ini dikarenakan dapat menghasilkan ammonia. Uap dari ammonia ini menyebabkan peradangan jaringan gigi dan mampu merangsang bradikinin sebagai mediator nyeri.²

Perawatan gigi yang mengalami karies sehingga menyebabkan peradangan jaringan pulpa dapat dirawat *pulp capping*. Bahan yang sering digunakan adalah

Kalsium Hidroksida ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Pada umumnya bahan ini digunakan sebagai antibakteri dalam perawatan endodontik, *pulp capping*, medikamen saluran akar sebagai desinfektan dan dapat mengeliminasi bakteri residual di daerah intra kanal.³ Kalsium hidroksida memiliki pH yang tinggi sehingga dapat menyebabkan peradangan kronis dan merusak jaringan lunak.⁴

Penelitian dengan memanfaatkan bahan alam bertujuan untuk menghasilkan obat-obatan untuk mencegah dan mengatasi penyakit karies gigi, salah satu adalah ekstrak propolis. Propolis merupakan produk resin lebah madu dari berbagai macam jenis tumbuhan yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme rongga mulut.

Propolis dapat menghambat mikroba patogen mulut seperti bakteri, jamur dan virus.⁵ Propolis juga dapat digunakan sebagai media penyimpanan gigi avulsi, obat *pulp capping*, pencegahan karies serta mencegah rasa hipersensitivitas pada gigi.² Penelitian terhadap propolis telah banyak dilakukan baik secara *in vitro* maupun *in vivo* dan hasilnya menunjukkan bahwa propolis memiliki beberapa aktivitas biologis dan farmakologis antara lain bersifat antibakteri terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif.^{9, 17}

Marcucci *et al* (2001) meneliti sifat antibakteri dari propolis ini bukan semata-mata disebabkan karena senyawa tunggal, namun karena efek sinergis dari beberapa senyawa yang ada dan memiliki daya antibakteri, yakni: *Flavonoid, flavon, tannin*, asam ferulat, ester asam fenol, terpenoid, asam sinamat dan berbagai ester asam kafeat.⁶ Sifat antibakteri yang dimiliki propolis, menjadi satu pertimbangan untuk menggunakan propolis sebagai bahan antibakteri.

BAHAN DAN METODE

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah : *petridisk, brander* dan korek api, *spreader, anaerobic jar, autoclave*, inkubator, neraca analitik, mikropipet, tabung reaksi dan rak tabung reaksi, gelas ukur 500ml dan *osse*. Alat yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan dalam autoclave. Bahan yang digunakan adalah ekstrak propolis, bakteri *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, bubuk kalsium hidroksida pro analisa 96% , *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB), *Mueller Hinton Agar* (MHA), aquades steril dan *gas pack*.

Bakteri pada penelitian ini menggunakan *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, dibiakkan pada media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) dalam tabung reaksi.

Ekstrak propolis (*Apis mellifera*) ini berasal dari resin lebah perkebunan di Lawang Kabupaten Malang yang diekstrak menggunakan pelarut etanol dengan metode maserasi, diperoleh ekstrak propolis murni

11,45%. Kalsium hidroksida yang digunakan bentuk sediaan bubuk pro analisa dengan konsentrasi 100%.

Pada penelitian awal, konsentrasi hambat minimal (KHM) ditentukan dengan melakukan serial dilusi tes dengan pengenceran ekstrak propolis dan membuat suspensi kalsium hidroksida. Dari hasil penipisan tersebut diperoleh ekstrak propolis 1,5% dan kalsium hidroksida 13%.

Uji antibakteri dilakukan dengan cara *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 dimasukkan kedalam media tabung yang berisi BHI. Diinkubasi selama 24 jam pada suasana anaerob dalam *anaerobic jar* dengan suhu 37°C selama 24 jam. Kultur *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 yang sudah tumbuh pada BHIB di standarkan 0,5 Mc Farland (1,5x 10⁸CFU/ml).¹⁵ Disediakan 3 buah tabung reaksi, masing-masing tabung berisi BHIB 5 ml dan 0,1 ml inoculum *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, kemudian 1 tabung ditambahkan ekstrak propolis 1,5%, dan 1 tabung lainnya ditambahkan suspensi kalsium hidroksida 13% . Inkubasi (37° C) selama 24 jam dalam *anaerobic jar*. Kultur bakteri pada ketiga tabung tersebut diambil sebanyak 0,1 ml bakteri menggunakan mikropipet, kemudian diratakan pada media *Muller Hinton Agar* dengan cara *spreading*. Inkubasi pada suhu 37° C selama 2 x 24 jam dalam *anaerobic jar*. Konsentrasi hambat minimal adalah konsentrasi terendah dari bahan ekstrak propolis dan kalsium hidroksida yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji sebesar 90% dibandingkan kontrol positif.⁸ Pengamatan jumlah koloni yang tumbuh pada MHA yang dinyatakan dengan *Colony Forming Unit* (CFU).⁷

HASIL

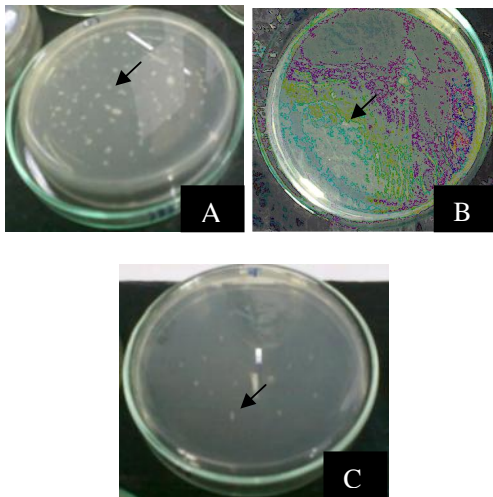
Hasil penelitian mengenai perbedaan daya antibakteri ekstrak propolis dan kalsium hidroksida terhadap *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 dengan membandingkan jumlah koloni yang tumbuh pada media *Mueller Hinton Agar*

Tabel 1 Rerata hasil penghitungan jumlah koloni bakteri *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 setelah pemberian ekstrak propolis 1,5% dan kalsium hidroksida 13%

Perlakuan	n	\bar{X} (CFU)	SB
Kontrol positif	7	57.14	4.880
KHM Ekstrak propolis 1,5%	7	5.57	1.133
KHM Kalsium hidroksida 13%	7	5.00	0.816

Keterangan: \bar{X} = jumlah sampel
 \bar{X} = rerata
 SB = simpang baku

Hasil pertumbuhan koloni pada media *Mueller Hinton Agar* (gambar 1)



Gambar 1 Koloni bakteri *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 pada MHA (tanda panah menunjukkan koloni bakteri) (A) kontrol positif (B) kalsium hidroksida (C) ekstrak propolis

Sebelum dilakukan uji beda antar kelompok pengukuran koloni *Fusobacterium nucleatum*, masing-masing diuji distribusi datanya terlebih dahulu dengan uji statistik *Kolmogorov Smirnov Test* dan homogenitas variansnya dengan uji

statistik *Levene's Test* Hasil kedua uji tersebut dapat diketahui hasil data uji normalitas menunjukkan $p > 0,05$ sehingga data tersebut berdistribusi normal. Uji homogenitas hasil data yang diperoleh $p > 0,05$ sehingga dapat disimpulkan variasi pada tiap kelompok data adalah homogen.

Untuk mengetahui perbedaan jumlah koloni *Fusobacterium nucleatum* semua kelompok perlakuan, dilakukan dengan uji statistik *Oneway Annova Test*. Uji statistik ini dapat dilakukan pada kelompok-kelompok tersebut karena memiliki distribusi data yang normal dan varians data yang homogen.

Hasil uji perbedaan jumlah koloni *Fusobacterium nucleatum* antar kelompok menggunakan tes *One Way Annova*, p value < 0.05 hal ini dapat diartikan bahwa adanya perbedaan yang signifikan jumlah koloni *Fusobacterium nucleatum* yang tumbuh pada *Mueller Hinton Agar* (MHA) antara pemberian ekstrak propolis 1,5% dan kalsium hidroksida 13%.

Dilanjutkan *Tukey HSD* untuk melihat signifikansi perbedaan jumlah koloni bakteri antar kelompok penelitian. Hasil *Tukey HSD* dapat dilihat dari tabel berikut:

Tabel 2 Hasil Uji Tukey HSD

Kelompok	Kontrol positif	Ca(OH) ₂ 13%	Ekstrak propolis 1,5%
Kontrol positif	-	0.000*	0.000*
Ca(OH) ₂ 13%	0.000*	-	0.930
Ekstrak propolis 1,5%	0.000*	0.930	-

Keterangan : * ada beda yang bermakna

Dari data uji HSD diatas, pada ekstrak propolis 1,5% dan Ca(OH)₂ 13% terhadap kontrol positif menunjukkan p value = 0.000, tetapi pada ekstrak propolis 1,5% terhadap Ca(OH)₂ 13% p value = 0.930, karena p value > 0.05 maka dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan

yang bermakna dari rerata jumlah koloni yang tumbuh pada ekstrak propolis 1,5% dan Ca(OH)_2 13% terhadap *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian pendahuluan pada kedua bahan tersebut diperoleh konsentrasi yang berbeda. Diperoleh KHM ekstrak propolis sebesar 1,5% sedangkan KHM kalsium hidroksida 13%. Konsentrasi tersebut merupakan KHM dari masing-masing bahan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. Penggunaan KHM lebih dipilih dari pada konsentrasi bunuh minimal (KBM), hal ini agar dapat dihitung jumlah koloni yang tumbuh pada MHA saat uji statistik. Adanya penurunan pertumbuhan bakteri pada MHA dengan adanya jumlah koloni yang tampak pada permukaan media ini lebih sedikit dari jumlah koloni pada media kontrol positif.

Kalsium hidroksida atau Ca(OH)_2 , yaitu bahan yang biasa digunakan sebagai perawatan *pulp capping*. Kalsium hidroksida mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 yang merupakan bakteri anaerob obligat gram negatif karena memiliki sifat antibakteri dengan menciptakan suasana basa mencapai pH 12,5 di lingkungan bakterial dengan cara melepaskan ion hidroksil.³ Pelepasan ion hidroksil akan mempengaruhi kelangsungan hidup bakteri. Hal ini dikarenakan DNA bakteri yang awalnya bersifat asam berubah menjadi bersifat alkali sebab lingkungan sekitarnya bersifat alkali, sehingga dapat mengakibatkan kerusakan pada membran sitoplasma. Ion hidroksil dengan pH alkalin apabila kontak langsung dengan protein membran sitoplasma bakteri akan merusak ikatan hidrogen pada struktur protein. Kerusakan pada ion hidrogen ini akan menyebabkan perubahan pada ikatan rantai polipeptida. Ikatan hidrogen ini berfungsi untuk menstabilkan struktur molekul protein. Apabila terjadi kerusakan pada struktur ini dapat mengakibatkan denaturasi protein atau hilangnya fungsi alami dari

protein yang akan mengakibatkan rusaknya struktur fungsi DNA bakteri, sehingga bakteri mengalami hambatan replikasi, proses mutasi tidak terjadi dan akhirnya menyebabkan kematian bakteri *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586.

Penggunaan ekstrak propolis juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 dengan senyawa-senyawa yang terdapat di dalamnya. Efek antibakteri ekstrak propolis ini tidak hanya semata-mata karena senyawa tunggal, namun karena adanya efek sinergis dari beberapa senyawa yang terkandung diantaranya: Flavonoid, flavon, tannin, asam ferulat, terpenoid, ester asam fenol, asam sinamat dan berbagai ester asam kafeat.¹⁰ Flavonoid merupakan senyawa aktif dan terpenting dalam ekstrak propolis yang meliputi hampir 50% dari komposisi propolis. Zat tersebut dimungkinkan dapat mempengaruhi hasil penelitian pada bakteri *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. Ikatan fenol yang terdiri dari *flavonoid* dan *flavon* dapat mengikat protein ekstraseluler dan protein integral yang bergabung dengan dinding sel bakteri sehingga menyebabkan ion Na^+ dan K^+ tidak berfungsi, keadaan ini menyebabkan ion sodium tertahan di dalam sel, sehingga terjadi perubahan kepolaran pada plasma sel yang berakibat osmosis cairan ke dalam plasma sel.¹¹ Senyawa terpenoid akan bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Porin adalah tempat pintu keluar masuk dari substansi, ketika rusak maka akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri yang akan mengakibatkan sel bakteri kekurangan nutrisi sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati.¹² Selain itu terdapat senyawa Tanin yang dapat menginaktivasi protein enzim, dan lapisan protein transport sehingga menghambat kerja enzim endonuklease retriksi sehingga transkripsi tidak terjadi pada RNA dan hal ini mengganggu permeabilitas dinding sel, merusak dinding sel, dan melisis sel.¹³

Mekanisme propolis dalam menghambat pertumbuhan bakteri belum sepenuhnya diketahui, namun demikian

adanya beberapa komponen yang terdapat pada propolis yang mampu mengabsorpsi sinar ultraviolet sehingga menghambat kerja enzim polimerase RNA bakteri untuk melekat pada DNA sehingga replikasi DNA bakteri tidak terjadi.¹³ Selain itu, komponen tersebut juga menghambat kerja dari enzim endonuclease restriksi sehingga tidak terjadi transkripsi pada RNA. Hal ini mengakibatkan tidak terjadinya pembelahan sel bakteri karena terganggunya sintesis protein. Mekanisme antibakteri propolis terhadap bakteri sangat kompleks dan efektifitasnya dapat meningkat pada suhu 37°C dan pada suasana lingkungan dengan pH 5.¹⁴

Adanya penggunaan etanol sebagai bahan pelarut ekstrak propolis pada penelitian ini dapat dijadikan pertimbangan ekstrak propolis lebih efektif sebagai bahan antibakteri dari pada kalsium hidroksida terhadap *Fusobacterium nucleatum*.¹⁶ Hal ini dikarenakan etanol memiliki berat molekul yang kecil sehingga mampu menembus dinding bakteri gram negatif dengan membawa senyawa-senyawa sinergis yang terkandung dalam ekstrak propolis sehingga dapat mengganggu pembentukan DNA pada bakteri.¹¹

Kalsium hidroksida memiliki sifat antibakteri, akan tetapi pada penelitian sebelumnya diperoleh tingkat toksisitas kalsium hidroksida lebih tinggi dari ekstrak propolis sebab lebih mudah mengalami disosiasi karena bahan pelarut yang berupa air membuat struktur kimianya menjadi lebih mudah terurai dan ion hidroksil yang akan dihasilkan menjadi lebih banyak dan penggabungan dengan membran sitoplasma semakin cepat.³

Pada penelitian ini memang tidak menunjukkan perbedaan daya antibakteri antara kalsium hidroksida dan ekstrak propolis terhadap jumlah koloni *Fusobacterium nucleatum* yang tumbuh pada MHA, akan tetapi tidak sepenuhnya penelitian ini tidak menghasilkan perbedaan. Hal ini dibuktikan bahwa pada konsentrasi 13% kalsium hidroksida mampu menghambat pertumbuhan jumlah koloni bakteri pada MHA, namun ekstrak propolis hanya membutuhkan konsentrasi 1,5% untuk menghambat pertumbuhan jumlah koloni

bakteri *Fusobacterium nucleatum*. Hasil ini membuktikan bahwa dengan konsentrasi rendah ekstrak propolis sudah mampu sebagai antibakteri, tidak seperti kalsium hidroksida yang membutuhkan konsentrasi lebih tinggi meskipun jumlah bakteri yang tumbuh pada kalsium lebih sedikit dari pada ekstrak propolis.

Hasil uji statistik dengan membandingkan kedua bahan ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna daya antibakteri kalsium hidroksida konsentrasi 13% dan ekstrak propolis konsentrasi 1,5% terhadap *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. Keadaan ini kemungkinan terjadi karena pada penelitian pendahuluan saat menentukan KHM ekstrak propolis dan kalsium hidroksida menggunakan rentang konsentrasi yang terlalu jauh, selain itu pada teknik penghitungan jumlah koloni dilakukan tidak menggunakan alat yang lebih detail seperti *Quebec Colony Counter*, sehingga tidak menghasilkan perbedaan nilai yang bermakna diantara kedua bahan tersebut.

Hasil penelitian ini diperoleh jumlah bakteri *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 yang tumbuh pada MHA dengan pemberian kalsium hidroksida lebih sedikit dibandingkan dengan hasil menggunakan ekstrak propolis. Hasil ini dapat dipengaruhi oleh karena kalsium hidroksida memiliki kemampuan mengubah suasana menjadi alkali bukan dikarenakan kandungan yang dimiliki oleh kalsium hidroksida itu sendiri yang memiliki daya antibakteri, sehingga banyak dinding bakteri yang sensitif terhadap suasana tersebut menyebabkan bakteri *Fusobacterium nucleatum* lebih banyak lisis. Berbeda dengan ekstrak propolis yang memiliki daya antibakteri murni berasal dari kandungan senyawa-senyawa propolis itu sendiri.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan daya antibakteri ekstrak propolis 1,5% dan kalsium hidroksida 13% terhadap *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586.

DAFTAR PUSTAKA

1. Maripandi A, Kumar AT, and Salamah A. 2011. *Prevalence of dental caries bacterial pathogens and evaluation of inhibitory concentration effect on different tooth pastes against Streptococcus spp.* African Journal of Microbiology Research. pp. 1778-1783
2. Hahn CL, Falkler WA. 1993. *Correlation between thermal sensitivity and microorganisms isolated from deep caries*. J Encoded.p:26–30.
3. Siqueira JF, Lopes HP. 1999. *Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review (Review)*. International Endodontic Journal, p: 361-369
4. Kousedghi H, Ahangari Z, Eslami G, and Ayatollahi A. 2012. *Antibacterial activity of propolis and Ca(OH)₂ against Lactobacillus, Enterococcus faecalis, Peptostreptococcus and Candida albicans*. African Journal of Microbiology Research. p. 3510-3515
5. Hayacibara MF, Koo H, Rosalen PL, Duarte S, Franco EM, Bowen WH, Ikegaki M, Cury JA. 2005. *In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development*. J Ethnopharmacol p.101-110
6. Marcucci MC, Ferreres F, García VC, Bankova VS, Castro SL, Dantas AP, Valente PHM, Paulino N . 2001. *Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities*. J Ethnopharmacol. p.105-112.
7. Santy A. 2009. *Konsentrasi Hambat minimal dan Bunuh Minimal Ekstrak Aloe Vera Terhadap Bakteri Streptococcus alfa hemoliticus (Penelitian Eksperimental Laboratoris)*. Karya Tulis Akhir Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Program Studi Ilmu Konservasi Gigi. Universitas Airlangga. Surabaya.
8. Mahon, Connie R, George Manvoelis, Jr. 1995. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. New York: W.B Saunders Company Publications. p.61.
9. Sabir. 2005. *Aktivitas Antibakteri flavonoid Propolis Trigona spp Terhadap Bakteri Streptococcus mutans (in vitro)*. Dent-J. p.135
10. Bancova VS, Castro DSL and Marcucci MC. 2000. *Propolis: Recent Advances in Chemistry and Plant Origin*. Apidologie. p:3-15
11. Zenda. 2010. *Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Sirih (Piper Betle L) terhadap Propionibacterium acne dan Staphylococcus aureus Multiresisten*. Skripsi: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
12. Gunawan, 2008 . *Antibakteri pada Herba Menireh (Phyllanthus niruri Linn)*, Jurnal Kimia. p.31.
13. Simuth J, Trnovsk J, Jelokova J. 1986. *Inhibition of Bacterial DNA Dependent RNA Polymerases and Restriction Endonuclease by Uvabsorbing components from Propolis*. Pharmazie. p:131-2
14. Lua LC, Chenb YW, Choua CCT. 2005. *Antibacterial Activity of Propolis Against Staphylococcus aureus*, International Journal of Food Microbiology. p:213-220
15. Forbes BA, Sahm DF, and Weissfeld AS. 2007. *Laboratory Methods for Detection of Antibacterial Resistances*. Bailey Scott's Diagnostic Microbiology. 11th ed.St.Louis, Mosby Inc. p:142;229;516
16. Giovanna P, Luciane R, Fabiana C and Daniela A. 2008. *In vitro Antimicrobial Activity of Endodontic Pastes with Propolis Extracts and Calcium Hydroxide: A Preliminary Study*. Braz Dent J. p:301-305.
17. Moreno MN, Isla MI, Cudmani NG, Vattuone MA, Sampietro AR. 1999. *Screening of Antibacterial Activity of Amaiha del Velle Propolis*. J Ethnopharmacol.p:97-102